

XP-002271456

P.D. CU-10-00 2
P. 1-2

c:\epdata\sca\eplog\sa495612.log

15/15 - (C) FILE CAPLUS

STN CA Caesar accession number : 1826

AN - 1978:191467 CAPLUS

DN - 88:191467

TI - N.alpha.-Acyl-.alpha.-L-amino acid anilides

IN - Baba, Yoshihiko; Yabe, Yuichiro; Minato, Sadamasa

PA - Sankyo Co., Ltd., Japan

SO - Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 5 pp.

CODEN: JKXXAF

DT - Patent

LA - Japanese

FAN.CNT 1

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
------------	------	------	-----------------	------

PN - JP52148032	A2	19771208	JP 1976-63785	
-----------------	----	----------	---------------	--

9760601

JP58026745B	B4	19830604		
-------------	----	----------	--	--

PRAI- JP 1976-63785		19760601		
---------------------	--	----------	--	--

IT - 66253-15-4P

RL: SPN (Synthetic preparation); PREP (Preparation)
(prepn. of)

RN - 66253-15-4 CAPLUS

CN - Carbamic acid,

2-[[4-(diethylamino)phenyl]amino]-1-(1H-indol-3-
ylmethyl)-2-oxoethyl]-, phenylmethyl ester, (S)- (9CI) (CA

INDEX

NAME)

bsolute stereochemistry.

24.02.2004 10:20:45

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 52-148032

(43)Date of publication of application : 08.12.1977

(51)Int.Cl.

C07C103/50
C07C102/00
C07C103/75
// G01N 33/16

(21)Application number : 51-063785

(71)Applicant : SANKYO CO LTD

(22)Date of filing : 01.06.1976

(72)Inventor : BABA YOSHIHIKO

YABE YUICHIRO

MINATO SADAMASA

(54) N-ALPHA-ACYL-ALPHA-L-AMINO ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: N α -Acyl- α -L-amino-acid-p-substituted-anilide I(R is branched chain of basic- α -L-amino acid or aromatic- α -L-amino acid ; R1 is acyl ; R2 is OH, methoxy, dimethylamino or diethylamino), e.g. N α -benzyloxy-carbonyl-L-arginine-p-hydroxyanilide.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨日本国特許庁
公開特許公報

⑩特許出願公開
昭52—148032

⑪Int. Cl.² 識別記号 ⑫日本分類 庁内整理番号 ⑬公開 昭和52年(1977)12月8日
C 07 C 103/50 16 C 312.2 7430—43
C 07 C 102/00 16 C 421 7248—43 発明の数 1
C 07 C 103/75 // 113 E 6 6904—49 審査請求 未請求
G 01 N 33/16

(全5頁)

⑭N^α-アシル-α-L-アミノ酸アニリド化合物

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社中央研究所内

⑮特 願 昭51—63785

⑯発 明 者 湊貞正

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社醸酵研究所内

⑰出 願 昭51(1976)6月1日

⑱出 願 人 三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目1番地の6

⑲発 明 者 馬場義彦

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社中央研究所内
矢部裕一郎

⑳代 理 人 弁理士 樫出庄治

同

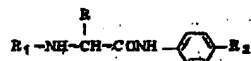
明 細 書

1 発明の名称

N^α-アシル-α-L-アミノ酸アニリド化合物

2 特許請求の範囲

式



(式中、Rは塩基性α-L-アミノ酸又は芳香族α-L-アミノ酸の側鎖の基を示し、R₁はアシル基を示し、R₂は水酸基、メトキシ基、ジメチルアミノ基又はジエチルアミノ基を示す)を有するN^α-アシル-α-L-アミノ酸ペラ-置換アニリドおよびその酸付加塩。

3 発明の詳細な説明

本発明は新規なα-L-アミノ酸誘導体に関し、更に詳しくは一般式



(1)

(式中、Rは塩基性α-L-アミノ酸又は芳香族α-L-アミノ酸の側鎖の基を示し、R₁はアシル基を示し、R₂は水酸基、メトキシ基、ジメチルアミノ基又はジエチルアミノ基を示す)を有するN^α-アシル-α-L-アミノ酸ペラ-置換アニリドおよびその酸付加塩に関する。

前記一般式(I)において、塩基性α-L-アミノ酸とはL-リジン、L-アルギニンであり、芳香族α-L-アミノ酸とはL-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファンであつて、その側鎖の基とは4-アミノブチル基、γ-グアミジノプロピル基、ベンジル基、p-ヒドロキシベンジル基、インドール-3-イルメチル基である。R₁で示されるアシル基とはアセチル、ベンゾイル、カルボキシプロピオニル、ベンジロキシカルボニルのイリを基である。

本発明に係る前記一般式(I)を有する化合物はトリプシンまたはキモトリプシンの優れた基質として使用される。これらの酵素は膵臓能の診

断の指標となるため、これら酵素基質は臨床上
有益な知見を得るに役立つ。

従来、トリプシンおよびキモトリプシンの弱
色基質としては主としてそれぞれアシル化塩基
性アミノ酸パラニトロアニリド、アシル化芳香
族アミノ酸パラニトロアニリドが使用されてい
た。しかしながら、これらの化合物は酵素反応
を行なうための緩衝液に往々にして難溶であり、
安定した測定値を得るための換液に溶解させる
ためには界面活性剤を加えるなど特別な操作を
必要とした。

本発明者等は溶解性のよい安定な測定値の得
られる化合物について種々研究を重ねた結果、
前記一般式(1)を有する化合物が優れた基質であ
ることを見出した。

本発明に係る前記一般式(1)を有する化合物は
常法によつて製造することが出来るが、一例を
あげると次の通りである。例えばアミノ基を保護
された一般式

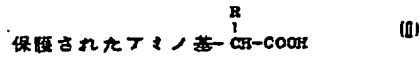
(3)

等の反応性誘導体があげられる。この反応の際
のアミノ基の保護基としては後に後述を条件で
除去しうる若て通常のペプチド合成に使用し得
る基例えば異化水素処理、接触還元等を経て除去
し得るベンジルオキシカルボニル基、ヒドラジ
ンで除去しうるフタリル基、弱い酸性条件下で
除去しうる *tert*-ブトキシカルボニル基、弱い
塩基性条件下で除去しうるトリブスロアセチ
ル基等があげられる。保護基を除去された遊離
のアミノ酸アニリドには、酸無水物、酸塩化物
などにより目的とするアシル基を導入する。得
られたアシル化アミノ酸アニリドのうち、アシル
化塩基性アミノ酸アニリドは所望により常法
によつて種々の酸塩、有機酸による酸付加塩に
変換することが出来る。

酵素活性は、適当な緩衝液中で酵素と基質と
を接触させ、酵素反応によつて遊離したパラ
置換アニリンを定量することによつて測定され
る。

次に実施例および試験例をあげて本発明を更

(5)



(式中、Rは前述した塩基性アミノ酸および芳
香族アミノ酸の側鎖の基を示す)を有するアミ
ノ酸を活性化剤の存在下でパラ-置換アニリン
と反応させるか、前記一般式(1)を有するアミ
ノ酸のカルボキシル基における反応性誘導体をパ
ラ-置換アニリンと反応させて得られる。使用
した保護基が目的とするアシル基の場合はこの
ままでよいが、目的とするアシル基と異なる場合
は一旦これを除去したのち改めて目的とするア
シル基を導入するためにアシル化を行なう。ま
た、リシンのように二個のアミノ基を有する場
合は、一アミノ基を選択的除去可能な保護基で
保護し、最後にその脱離を行なう。

活性化剤或いは反応性誘導体としては通常の
ペプチド合成の際に使用し得るものの特に限定
なく使用することが出来る。例えばジシクロヘ
キシルカルボジイミド、カルボニルジイミダゾ
ール等の活性化剤、混合酸無水物、活性エステル

(4)

に具体的に説明するが、本発明はこれによつて
限定されるものではない。

実施例1 N^{α} -ベンジルオキシカルボニル-
L-アルギニン パラ-ヒドロキシアニリド

N^{α} -ベンジルオキシカルボニル-L-アル
ギニン 3.08 g をアセトン 50 ml に懸濁させ、こ
れに規定塩酸 5 ml を加えて全溶させる。この
溶液を減圧で濃縮乾固し、シロップ状の残渣を
ジメチルホルムアミド 50 ml に溶かして -20
℃ に冷却し、N-メチルセルロリン 10 g を加
える。混合物をよく攪拌しながら、これにクロ
ルと酸エチル 10 g を加え、15 分後にパラ
アミノフェノール 1.2 g を加える。混合物の温
度を 0℃ に上げ一夜攪拌を続けた後減圧で濃縮
する。シロップ状の残渣に塩化メチレンを加え
攪拌して洗い、塩化メチレンを揮発して除くと
目的化合物が得られる。この化合物 0.47 g をシ
リカゲル [ワコーゲル C-200 (商品名)、
25 g] を使用したカラムクロマトグラフィー
[展開溶剤: クロロホルム-エタノール-酢酸

(6)

(20:5:1))で精製し酢酸エチルで結晶化すると融点100~102℃を有する純品0.35gが得られる。 $[\alpha]_D^{25} = 135^\circ$ (C=1.1, H₂O)。

元素分析値 $C_{20}H_{25}O_4N_5 \cdot CH_3COOH \cdot \frac{1}{2} H_2O$

計算値 C, 56.40; H, 4.45; N, 14.95.

実測値 C, 56.51; H, 4.60; N, 14.47.

実施例2 N⁶-ベンジルオキシカルボニル-L-トリプトファン β-ラージエチルアミノアニリド

N⁶-ベンジルオキシカルボニル-L-トリプトファン 3.58gおよびN,N-ジエチル-β-ラージエチルアミン 181gをテトラヒドロフラン 30mlに溶かし、氷冷下にジシクロヘキシルカルボジイミド 227gをテトラヒドロフラン 5mlに溶かした冷溶液を加え、0℃で2時間次いで室温で一夜撹拌する。析出せるジシクロヘキシルウレアを濾去し、母液を減圧で濃縮すると固体残渣が得られる。これをエタノールから再結晶すると無色針状晶の目的化合物 4.27gが得られる。融点 189~190℃。

(7)

出する。これを濾取してエタノールから再結晶すると無色針状晶の目的化合物 2.0gが得られる。融点 190~191℃。 $[\alpha]_D^{25} = 40.5$ (C=10, 0.5規定塩酸)。

元素分析値 $C_{22}H_{26}O_4N_4$

計算値 C, 70.58; H, 2.19; N, 14.27.

実測値 C, 70.80; H, 2.25; N, 14.15.

実施例4 N⁶-3-カルボキシプロピオニル-L-リジン β-ラージエチルアミノニリド

a. N⁶-tert-ブトキシカルボニル-N⁶-ベンジルオキシカルボニル-L-リジン β-ラージエチルアミノニリド

N⁶-tert-ブトキシカルボニル-N⁶-ベンジルオキシカルボニル-L-リジン 4.17gおよびβ-ラージエチルアミン 135gをテトラヒドロフラン 30mlに溶かし、氷冷下ジシクロヘキシルカルボジイミド 227gをテトラヒドロフラン 5mlに溶かした溶液を加え、0℃で2時間、次いで室温で5時間撹拌する。析出せるジシクロヘキシルウレアを濾去し、母液を減圧で濃縮し真

元素分析値 $C_{25}H_{32}O_5N_4$

計算値 C, 71.88; H, 4.66; N, 11.56.

実測値 C, 71.94; H, 4.68; N, 11.64.

実施例5 N⁶-アセチル-L-トリプトファン β-ラージエチルアミノアニリド

N⁶-ベンジルオキシカルボニル-L-トリプトファン β-ラージエチルアミノアニリン 3.4gをメタノール 50mlに溶かし、1規定塩酸 1.4mlを加えた後10%ベラシウム-炭素 0.5gを使用して接触還元する。2時間後触媒を濾去し、母液を減圧で濃縮し真空で乾固する。残渣をジメチルホルムアミド 30mlに溶かし、氷冷下にトリエチルアミン 142gを加え、撹拌しながら無水酢酸 0.71gを加える。0℃で5時間撹拌した後無水酢酸 0.1gを加え40分間撹拌を続ける。不溶物を濾去し、母液を減圧で濃縮し、残渣を酢酸エチル 50mlに溶かす。この溶液を水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後減圧で濃縮し、シロップ状の残渣に少量のエタノールを加えて溶かし、放置すると結晶が析

(8)

出で乾固する。固体残渣をエタノールから再結晶すると無色の針状晶としてこの工程の目的化合物 5.5gが得られる。融点 167~169℃。

元素分析値 $C_{24}H_{30}O_4N_4$

計算値 C, 64.81; H, 2.27; N, 8.65.

実測値 C, 64.78; H, 2.39; N, 8.55.

b. N⁶-3-カルボキシプロピオニル-N⁶-ベンジルオキシカルボニル-L-リジン β-ラージエチルアミノニリド

N⁶-tert-ブトキシカルボニル-N⁶-ベンジルオキシカルボニル-L-リジン β-ラージエチルアミノニリド 2.5gを50%トリフルオール酢酸を含む塩化メチレン 50mlに溶かし、室温で15分間撹拌する。減圧で反応混合物を濃縮し、残渣にベンゼン 10mlを加えて再び減圧で濃縮し真空で乾固する。この操作を2度繰返した後シロップ状の残渣をジメチルホルムアミド 10mlに溶かして氷冷する。混合物にトリエチルアミン 0.49g次いでコハク酸無水物 0.72gを加えた後40℃で7時間撹拌する。反応混合

(9)

(10)

物より減圧で溶剤を留去し、シロップ状の残渣に10%クエン酸水溶液を加えて放置すると結晶が析出する。これを採取し、水、メタノールおよびエーテルで順次洗うとこの工程の目的化合物138gが得られる。融点148~153℃。

元素分析値 $C_{25}H_{31}O_7N_3$

計算値 C, 61.84; H, 6.44; N, 8.65.

実測値 C, 61.90; H, 6.50; N, 8.55.

c. N^6 -3-カルボキシプロピオニル-L-リジン パラ-メトキシアニリド

N^6 -3-カルボキシプロピオニル- N^6 -ベンジルオキシカルボニル-L-リジン パラ-メトキシアニリド168gをメタノール300mlおよび酢酸200mlの混合液に懸濁させ、1規定塩酸5.4mlを加え、10%パラジウム-炭素0.5gを使用して接触還元する。15時間還元を行なった後炭素を除去し、溶液を減圧で濃縮する。シロップ状の残渣にトリエチルアミン0.54gを含む塩化メチレン200mlを加え、沈澱を採取し、塩化メチレン次いでエーテルで洗い真空で乾燥

(11)

gが得られる。

ここに得られた粉末25gをメタノール700mlおよび水500mlの混合溶液に懸濁し、6N塩酸2mlを加える。これに5%パラジウム炭素触媒0.25gを加え、2時間接触還元を行なう。触媒を除去し、溶液を濃縮すると若干黒く着色した油状物が得られる。

上記油状物に水500mlを加え、更にテトラヒドロフラン500ml及び重炭酸ナトリウム17gを加える。次いでベンゾイルクロリド0.9gを加え氷冷下激しく攪拌する。25時間後減圧にてテトラヒドロフランを留去し、析出した粉末を採取する。メタノールより再結晶すると目的物175gが得られる。融点257~259℃。

$(\alpha)_D^{25} + 6.47$ (C=10, 酢酸エテル)

元素分析値 $C_{24}H_{25}O_5N_3$

計算値 C, 71.44; H, 6.25; N, 10.42.

実測値 C, 71.15; H, 6.15; N, 10.42.

試験例 キモトリブシン活性の測定

N^6 -ベンゾイルチロシン パラ-ジメチル

(13)

特開昭52-148032(4)する。このものを熱メタノール中で攪拌し、冷却後採取すると目的化合物0.7gが得られる。融点203~204℃。 $(\alpha)_D^{25} - 5.45$ (C=10, H_2O)。

元素分析値 $C_{17}H_{25}O_5N_3 \cdot \frac{1}{4} H_2O$

計算値 C, 57.57; H, 7.22; N, 11.81.

実測値 C, 57.52; H, 7.21; N, 11.64.

実施例5 N -ベンゾイル-L-チロシン パラ-ジメチルアミノアニリド

パラ-ジメチルアミノアニリン ジ塩酸塩5gをジクロルメタン100mlに懸濁し、トリエチルアミン70mlを加えて溶解せしめる。これに N -ベンジルオキシカルボニル-L-チロシン6.8gを加え、次いで氷冷下にジシクロヘキシルカルボジイミド5.8gを少量のジクロルメタンに溶かして加える。室温で一晩攪拌し析出したジシクロヘキシルウレアを除去し減圧にて濃縮する。残渣に酢酸エテルを加え抽出し水洗後無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮する。残渣にイソプロピルアルコールを加えると粉末58

(12)

アミノアニリド80mgをアセトン0.5mlに溶かし、1%のツウイン80および5mMの無水塩化カルシウムを含む0.1Mトリス緩衝液(pH 8.0)10mlを加えこれを基質緩衝液とする。

基質緩衝液1mlを試験管にとり、37℃に加温し、結晶キモトリブシン溶液(1.5mg/ml H_2O)0.05mlを加えてインキュベートする。30分後に反応停止呈色液(後記)5mlを加え、20分室温に放置した後660nmにおける吸光度を測定する。別に上記操作中キモトリブシン液の代わりに水0.05mlを用いる以外は全く同様にしてブランク値とする。この両値の差からキモトリブシン活性が得られる。このようにして測定された上記基質に対するキモトリブシンの k_m 値は0.61mM, V_{max} は0.123 μ mole/min./mgキモトリブシンであつた。

この方法は結晶キモトリブシン液の代わりにキモトリブシン活性を有する生体抽出液、血清等にも使用することができた。

反応停止呈色液: ナトリウム ペンタシアノア

(14)

ミノフエロエート 2 g を水 20 ml に溶かし、
 0.3% 過酸化水素水 60 ml を加え、更に 10
 当量 水素ナトリウム水溶液 20 ml を加える。
 この溶液に低分子デキストリン 4 g を加えて
 溶かし呈色液とする。この原液 1 ml に 0.25
 ml 乳白酸液 (pH 4.5、1% 塩化ナトリウム
 を含む) 50 ml を加えて反応停止呈色液とす
 る。

特許出願人 三 共 株 式 会 社
 代理人 弁 士 堀 出 庄 怡

(15)